



III- Les vecteurs de clonage

Rôle d'un vecteur : capable de transporter l'ADN d'intérêt (d'où le nom de vecteur), c'est un morceau d'ADN capable d'auto-réPLICATION. Il doit être petit de façon à être manipulé *in vitro*. Pour satisfaire à ces deux exigences, on utilise soit des plasmides soit des virus, soit des petits chromosomes.

1) *Les plasmides*

Les plasmides sont de petits morceaux d'ADN circulaires, double brin que l'on trouve dans les bactéries en dehors du chromosome. Ils se répliquent grâce aux enzymes présents dans la bactérie. On est capable de les introduire dans une bactérie par des méthodes chimiques (CaCl_2) ou des méthodes physiques (électroporation). C'est la transformation bactérienne (notion différente de la transformation des cellules eucaryotes).

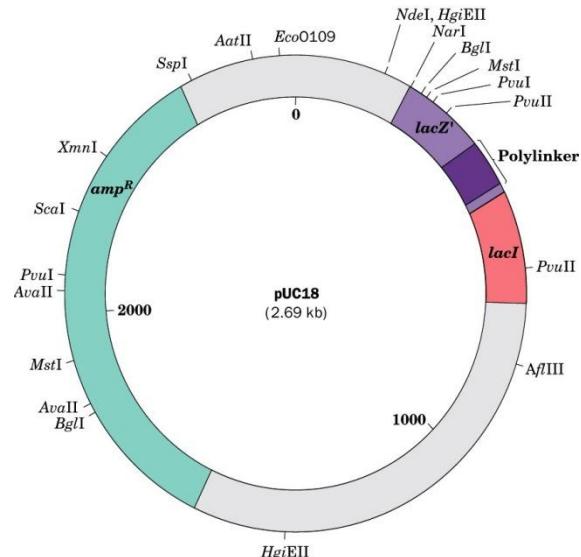
Plasmides

- 1-200 kb (généralement < 10 kb)
- origine de réplication
- nombre de copies variable (1-700 / cellule)
- site de clonage multiple (polylinker, MCS)
- marqueur de sélection (ex: amp^R)
- introduit par transformation dans des cellules compétentes clonage de fragments < 10kb

Les parties essentielles :

Une origine de réplication, importante pour l'initiation de la réplication.

Un site de restriction pour pouvoir insérer un fragment d'ADN (ce fragment d'ADN est souvent appelé insert).



Marqueur de sélection (Un gène de résistance aux antibiotiques): permet de sélectionner les bactéries ayant incorporés le plasmide de celles qui ne l'ont pas incorporé. La transformation est un événement rare, il n'y a qu'un faible nombre de bactéries qui sont transformées, il n'y a donc qu'un plasmide par bactérie. Si on isole cette bactérie et qu'on la fait pousser, on obtient un clone c'est à dire un grand nombre de bactéries identiques portant le même plasmide. Par extension, le terme de clone est souvent donné au plasmide lui-même.

Les parties accessoires

- Un polylinker ou site de clonage multiple.

L'insertion d'un insert dans un plasmide lorsqu'il n'y a qu'un seul site de restriction n'est pas facile. En effet, l'insert n'est pas obligatoirement borné par le site de restriction présent sur le plasmide. De plus, le vecteur peut se recirculer (à moins qu'on le déphosphoryle) et l'insert n'est pas orienté. Pour faciliter les clonages, on a inséré dans le vecteur une séquence présentant une série de sites de restriction uniques dans le vecteur, les uns à la suite des autres.

A l'origine, pour fabriquer ces polylinker, on ajoutait par ligation une série de petits oligonucléotides double brin contenant un ou plusieurs sites de restriction. Ces oligonucléotides ont le nom de linker par ce qu'on peut les utiliser pour ajouter des sites de restriction aux extrémités d'un fragment d'ADN, les sites de clonage multiples ont donc pris le nom de polylinker.

- Un gène codant pour le peptide α de la β -galactosidase.

Lorsqu'on veut insérer un fragment d'ADN dans un plasmide, on digère le vecteur avec un ou deux enzymes de restriction donnant des extrémités compatibles avec les extrémités de l'insert. Mais cette digestion n'est jamais totale. On a donc dans la solution des molécules de vecteur non digérées. De plus, lors de la ligation des deux ADN, vecteur et insert, une partie du vecteur se recircule si les deux extrémités sont compatibles et si la déphosphorylation n'a pas été totale. Après la transformation, on a donc des bactéries qui ont un vecteur seul et des bactéries qui ont le plasmide recombinant. Pour trier ces bactéries, on a inséré le site de clonage à l'intérieur d'un gène codant pour le peptide α de la β -galactosidase.

Le clonage de l'insert crée une mutation par insertion, inactivant le peptide. Si le plasmide est introduit dans une souche déficiente pour le peptide α , le vecteur seul permet la synthèse de galactosidase par contre le vecteur plus l'insert ne le permet pas. Les deux colonies peuvent être facilement triées en utilisant des substrats colorés de la β -galactosidase (X-gal par ex).

De plus, si on clone un fragment d'ADN codant pour une protéine, on a une chance sur trois que la phase de lecture de l'insert soit en concordance avec celle du peptide α . Une fois sur six, si le clonage est non orienté,

on aura production d'une protéine de fusion comprenant en N-terminal le peptide α suivi du peptide codé par l'insert. Ce peptide pourra alors être reconnu par un anticorps.

- Promoteurs d'ARN polymérases.

De chaque côté du site de clonage, on a souvent rajouté les promoteurs de la T3 ou T7 ARN polymérase. On peut donc fabriquer des ARN sur des plasmides ouverts en aval de l'insert en incubant l'ADN avec l'ARN polymérase en présence de ribonucléotides. Ces promoteurs servent donc entre autre à faire des sondes ARN ou pour faire des ARNc qui pourront être traduit *in vitro*. On peut également faire ainsi des ARN anti-sens.

Les classes de plasmides :

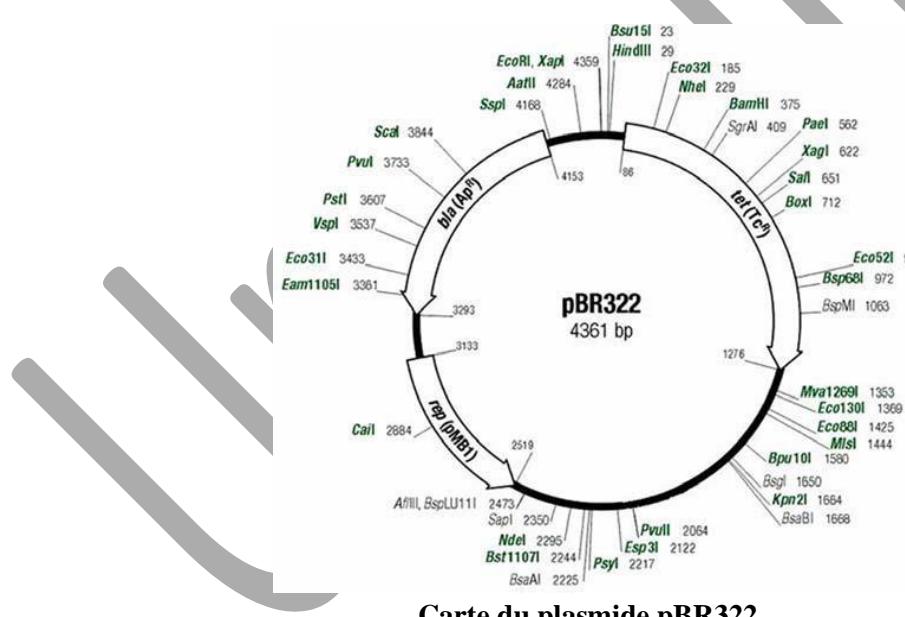
1/ Les plasmides de première génération : Ce sont les premiers à avoir été utilisés en génie génétique. Ce sont des plasmides à l'état naturel, non modifiés au laboratoire. Il s'agit des plasmides suivants :

- **ColE1**
- **RSF 2124**
- **pSC 101**

2/ Les plasmides de deuxième génération : Ce ne sont pas des plasmides naturels mais résultent de plusieurs transformations : plasmides "artificiels".

La série la plus importante de ces plasmides est la série pBR 312 à pBR 322.

Le plasmide pBR 322 est constitué de 4,4 Kb et possède deux gènes de résistance : un pour la tétracycline (TcR), l'autre pour l'ampicilline (ApR). Il possède, en plus, 20 sites uniques pour les endonucléases de restriction dont 11 localisés sur les deux gènes de résistance.



Carte du plasmide pBR322

http://www.edu.upmc.fr/sdv/masselot_05001/genes_et_genomes/vecteurs.html

Les plasmides de troisième génération : Ce sont des plasmides pBR à l'origine mais rendus plus performants et permettant d'obtenir des recombinants sans passer par des sous-clonages. Un plasmide pUC (plasmide of University of California) est un plasmide pBR dans lequel on a remplacé le gène de résistance à la tétracycline (qui sert à repérer les plasmides recombinés) par un gène bactérien lacZ.

La famille pUC : Ont une taille qui avoisine 2,6 Kb et ayant intégré les gènes de résistance à l'ampicilline (ApR) et lacZ. Un polylinker identique à celui du phage M13 est associé à lacZ. Les différents pUC (de pUC8 à pUC19) ne diffèrent que par le nombre de nucléotides et l'emplacement du polylinker :

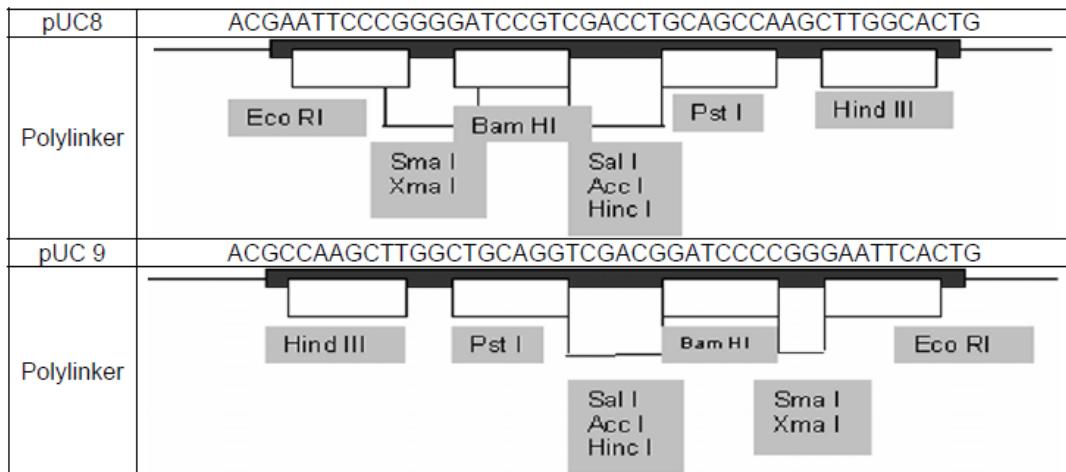


Figure : polylinkers de pUC8 et pUC9

Le polylinker du plasmide pUC 19 contient, en plus Sph I, Xba I, Kpn I et Sst I par rapport à pUC8 et Hinc II au lieu de Hinc I.

Il existe d'autres familles de plasmides de troisième génération, telles que les familles pSP et pGEM®.

2) Les phages

Bactériophage I

- clonage jusqu'à 16 kb
- *in vitro* packaging

Bactériophage filamenteux M13

- DNA circulaire simple brin

Baculovirus

- Virus infectant des cellules d'insectes

Le phage λ

Ce phage est un des modèles de laboratoire au même titre que la souris, la drosophile ou le nématode *Caenorhabditis elegans*. Les connaissances accumulées sur ce phage ont permis de l'utiliser comme vecteur. C'est un virus à ADN double brin, linéaire de 50 kb avec à ses deux extrémités 12 nucléotides simple brin complémentaires (extrémité cohésives ou cos). Il se fixe sur le récepteur lamB qui permet l'absorption de maltose par la bactérie. Seul l'ADN rentre dans la bactérie. Une fois dans la bactérie, les extrémités cohésives s'hybrident et l'ADN est ligué par une ligase d'*E. coli*. Là, il y a deux possibilités, soit un cycle lysogénique avec intégration de l'ADN du phage dans le génome soit un cycle lytique. C'est ce cycle lytique qui est utilisé dans les vecteurs. On incube donc une solution de phage avec une solution de bactérie. Après une quinzaine de minutes, les phages sont rentrés dans les bactéries et on étale, sur un milieu de culture solide dans une boîte de pétri, la solution comportant ces bactéries dont certaines ont incorporé un phage. Le phage lyse la bactérie, puis attaque les bactéries les plus proches par diffusion. Lorsque la culture bactérienne arrive à confluence (tapis bactérien sur la boîte), les bactéries n'expriment plus certaines protéines de surface comme les porines ou le récepteur maltose. En l'absence de récepteur, les phages ne peuvent plus attaquer les bactéries. On obtient un tapis bactérien avec une plage de lyse correspondant à la descendance d'un seul phage, c'est à dire un clone.

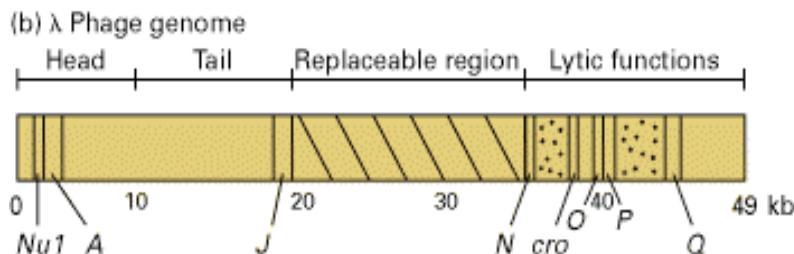
Le phage λ en tant que vecteur :

Dans le phage λ , la longueur de 50 kb de son ADN est importante pour l'empaquetage. Les 20 kb au milieu du génome ne sont pas importants pour le cycle lytique mais nécessaires pour le cycle lysogénique.

Pour l'utiliser en tant que vecteur on retire ces 20 kb et on insère à la place le fragment d'ADN d'intérêt. On a alors un bras gauche 20 kb et un bras droit 10 kb. La purification des bras s'effectue par centrifugation zonale, les brins d'ADN ont en effet la même densité mais des masses différentes.

La sélection des recombinants peut être effectuée par plusieurs méthodes:

- Physique : si on purifie les bras droit et gauche, ils sont trop petits pour être insérés dans la capsid qui n'admet que des faibles variations de taille (40-55kb).
- Génétique: on peut toujours avoir les 20 kb d'origine si la purification des bras n'a pas été bien faite.



Intérêt du phage λ :

On dispose d'un moyen très efficace pour faire rentrer l'ADN dans la bactérie. En effet, un virus infecte une cellule bien plus efficacement qu'une méthode de transformation physico-chimique. Il faut toutefois faire au préalable un empaquetage *in vitro* qui consiste à rassembler dans un tube l'ADN, la tête et la queue du phage. Le criblage des banques avec un anticorps ou avec une sonde nucléotidique est plus aisé que lorsqu'on utilise un plasmide. Les plages de lyse sont plates et il est plus facile de faire une réplique sur ces boîtes que sur une population de colonies bactériennes.

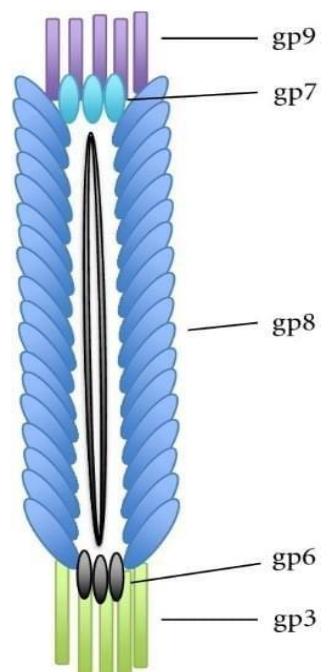
Utilisation du phage λ : principalement pour faire des banques, on profite ainsi des plages de lyse qu'il est plus facile à cibler que des colonies. On l'utilise pour des banques génomiques dans ce cas les inserts font de 15 à 20 kb, ou pour des banques d'ADNc. Dans ce dernier cas, les inserts sont plus petits (<10 kb) et n'influencent pas l'empaquetage *in vitro*.

Le phage M13

C'est un bactériophage de 6.4 kb, ADN simple brin, qui contient une dizaine de gènes. Il infecte seulement les bactéries qui expriment le pilus sexuel codé par le facteur F. Il pénètre par le pilus, la protéine de structure g8p est retirée et l'ADN est transféré dans le corps principal de la bactérie. Ce brin d'ADN (appelé brin +) est alors converti en double brin circulaire appelé ADN RF (forme réplicative). Cette conversion est due à des enzymes bactériens, une ARN polymérase initie la réplication qui est effectuée par une ADN polymérase. La transcription des gènes viraux peut alors avoir lieu.

La protéine produit du gène II introduit un nick à un site spécifique du brin +, plus il y a de formes réplicatives, plus il y a de protéines produit du gène II, si bien qu'à partir d'une certaine quantité de plasmide, ceux-ci sont tous ouverts.

Une ADN polymérase ajoute des nucléotides en 3' en déplaçant le brin + originel (Rolling circle). Une fois qu'un tour a été fait, le produit du gène II coupe au même endroit, libérant un brin linéaire qui est alors recirculé.



Au début de l'infection ce brin est de nouveau transformé en forme réplicative mais lorsqu'il y a beaucoup de forme réplicative, le produit du gène V (SSB single strand binding protein) s'accumule. Il y a production presque uniquement de forme simple brin. La balance entre les deux formes, double brin et simple brin dépend donc de la concentration en ADN double brin du phage, qui après transcription et traduction, produit la protéine II responsable du nick à l'origine de la réplication en

rollingcircle et produit les SSB protéines qui stabilisent le simple brin empêchant la synthèse du brin complémentaire.

L'ADN n'est pas encapsidé dans une structure préformée comme les autres bactériophages. Ils sont simplement couverts des protéines de la capsid lorsque'ils sortent de la bactérie. Ceci implique qu'il n'y a pas de limitation dans la taille de l'ADN simple brin. Il n'y a pas de lyse de la bactérie si bien qu'elle continue à pousser (plus doucement) en produisant des phages qui atteignent le nombre de 10^{12} par ml de culture.

Tous les gènes sont essentiels mais on peut insérer un fragment d'ADN dans la forme réplicative. Un polylinker a été introduit avec la séquence codante pour le peptide α de la β galactosidase comme pour les plasmides. La construction s'effectue dans la forme réplicative avec les méthodes utilisées pour les plasmides, en utilisant les DNases de restriction et la ligase.

Utilisation : lorsqu'on a besoin d'ADN simple brin, séquence (méthode enzymatique), mutagenèse dirigée, obtention de sondes sens spécifique...

3) *Chromosomes*

Plusieurs chromosomes peuvent être utilisés comme vecteur

-YAC (yeast artificial chromosome) : sont dérivés des chromosomes de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils contiennent une origine de réplication, un centromère et deux télomères. Ces vecteurs ont été principalement utilisés pour réaliser des clonages positionnels mais cette application est aujourd'hui abandonnée car elle est difficile à réaliser et qu'il y avait trop de recombinaisons.

- BAC chromosomes bactériens artificiels (Bacterial artificial chromosome) : sont des dérivés du facteur F. Leur taille est d'environ 100 kb, et ils se maintiennent chez *E. coli* comme simple copie.

- PAC (P1 artificial chromosome) : des vecteurs dérivés du phage P1 qui ont une capacité de clonage allant jusqu'à 100kb.

4) *Systèmes hybrides*

Phagemide :

(Plasmide + M13) : On peut introduire une origine de réplication simple brin dans un plasmide, on obtient un phagemide (comme la plupart des plasmides ont maintenant une origine de M13, cette dernière appellation tombe en désuétude). Le phagemide est un plasmide qui contient l'origine de réplication de M13. Cette région de M13 contient le site de coupure de la protéine du gène II pour l'initiation de la réplication en rollingcircle, une séquence suffisante pour le packaging de l'ADN simple brin dans les particules du phage, une séquence utile pour la synthèse du brin -, et une séquence de terminaison, site de coupure de l'ADN simple brin et site de recircularisation par la protéine du gène II.

On les cultive comme des plasmides mais si on veut du simple brin on infecte la bactérie avec un autre M13. Le M13 produit toutes les protéines pour la réplication en simple brin et l'encapsidation si bien que les deux ADN, du M13 et du plasmide sont encapsidés. En purifiant le virus on obtient les deux ADN.

Pour obtenir une plus grande quantité de simple brin du plasmide par rapport à celui du phage on utilise un phage muté dans la zone de coupure par la protéine du gène II comme le M13K07. On appelle ces phages «phages Helper». Ils ne peuvent pas eux-mêmes être encapsidés.

Cosmide :

Les cosmides sont des vecteurs artificiels hybrides : phage lambda-plasmides. On ajoute deux extrémités cos à un plasmide. Si on clone dans ce plasmide un grand fragment d'ADN (d'environ 45 kb) de telle façon que plasmide et insert font 50 kb, cet ADN pourra être encapsidé *in vitro* dans le phage λ . Il pourra donc être introduit avec une grande efficacité dans la bactérie. Par contre une fois à l'intérieur, il se répliquera comme un plasmide. Les extrémités cos permettent donc de sélectionner les recombinants avec de grands inserts (45 kb) et à introduire le plasmide dans la bactérie.

VI- Hôtes de clonage

En biotechnologie, le génie génétique est utilisé à des fins commerciales comme pour la production de nouveaux vaccins, des grandes quantités de protéines valorisables, ou l'introduction de gènes spécifiques dans un organisme animal ou végétale. Dans chaque cas, le choix de l'hôte est essentiel puisqu'il nous orientera vers un type de vecteur adapté.

Pour obtenir de grande quantité d'ADN cloné l'hôte idéal doit

- Se développer rapidement dans un milieu de culture peu onéreux.
- Être non pathogène.
- Être capable d'incorporer l'ADN.
- Être stable en culture
- Possède des enzymes appropriées pour la réPLICATION du vecteur.

Les hôtes répondant à ces critères sont des microorganismes eucaryotes ou procaryotes dont les génomes sont bien connus car entièrement séquencés, génétiquement manipulables.

Escherichia coli Bacillus subtilis Saccharomyces cerevisiae

Il faut noter que *E. coli* est l'organisme le plus utilisé en clonage moléculaire

Les mutations d'*E. coli* utilisées en biotechnologie

(DE3) : Insertion du gène de la l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur LacZ (dans le site d'attachement de lambda).

dut : les souches porteuses de cette mutation sont déficientes en UTPase et contiennent beaucoup d'UTP qui entre en compétition avec le TTP. Cette mutation est utilisée en association avec la mutation ung lorsque l'on désire avoir un ADN comportant des uraciles à la place des thymines, par exemple dans certaines méthodes de mutagenèse.

Δ(lac-proAB) : Délétion chromosomique de l'opéron lac et des gènes impliqués dans la synthèse de la proline. Les souches portant cette mutation ne peuvent utiliser le lactose comme source de carbone et ont besoin de proline pour leur croissance.

Δ(proAB) : Déletion des gènes intervenant dans la biosynthèse de la proline. ProAB est souvent complémenté par un gène sur F', ce qui permet de sélectionner les souches ayant gardé le facteur F' en les étalant sur milieu minimum.

gor 522: Tn10 (TcR) : inactivation de la glutathion réductase par Tn10. Le glutathion n'est plus réduit par la réductase, ce qui abaisse le pouvoir réducteur du milieu intracellulaire. Cette mutation favorise l'établissement de ponts disulfures des protéines recombinantes produites dans *E. coli*.

hsdR : Une souche qui porte la mutation hsdR code pour la méthylase de EcoK mais pas pour la DNase. On utilise cette mutation pour cloner des fragments d'ADN non méthylés tels que les fragments de PCR.

lacI^q : Le gène lacI code pour le répresseur lac. La mutation *lacI^q* augmente la concentration en répresseur dans la bactérie, en l'absence de lactose l'opéron lactose est mieux régulé.

mutS, mutD5, mutT : mutation dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Ces mutations sont utilisées pour faire de la mutagenèse au hasard.

recA : recA est le gène principal impliqué dans la recombinaison en aidant le transfert des brins entre les molécules d'ADN.

TraD36 : supprime le transfert du facteur F par conjugaison.

TrxB: Délétion de la thioredoxine réductase. Cette mutation favorise la formation des ponts disulfures des protéines recombinantes produites dans *E. coli*.

Les souches d'*E. coli* les plus utilisées

AD494 (DE3) :

Génotype : *trxB*

Utilité : Cette souche contient une copie du gène codant pour la T7 RNA polymérase en aval du promoteur *lacUV5*. Elle permet donc l'expression de gène en aval d'un promoteur T7. La délétion du gène codant pour la thioredoxinereductase (trxB) facilite la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme.

AG1 :

Génotype : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK- mK⁺) supE44 relA1*

BL21 :

Génotype : *E. coli B F⁻ dcmompThsdSB(rB⁻mB⁻) gal*

Utilité : expression de gènes

BL21 star :

Commercialisation : Invitrogen.

Cette souche dérivée de BL21 a en plus une mutation de rne qui abaisse la dégradation des ARNm.

BL21 (DE3) :

Cette souche dérivée de BL21 a intégré le phage λ DE3. Ce phage contient le gène codant pour l'ARN polymérase T7 en aval du promoteur *lacUV5*.

Utilité : production de protéines recombinantes dont le gène a été cloné en aval d'un promoteur reconnu par l'ARN polymérase T7. La production est induite par ajout d'IPTG.

BL21 (DE3) pLysS :

Cette souche dérivée de BL21 (DE3) contient en plus un plasmide codant pour le lysozyme.

Utilité : production de protéines recombinantes toxiques pour *E. coli*. La production est inhibée en l'absence d'induction.

C600 :

Génotype : *F⁻ thr-1 leuB6 thi-1 glnV44 rfbD1 fhuA21*

Utilité : clonage dans le phage λ

DH5 α

Génotype : *supE44 DlacU169 f80 lacZDM15 hsdR17 recA1' endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

DH5 α F' :

Génotype : *F' endA1 hsdR17(rK⁻mK⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA(Nal^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)*

DH5 α T1^r :

Commercialisation : Invitrogen

DH5 α avec le génotype *tonA* confère la résistance au phage T1.b

XL1-Blue :

Commercialisation : Stratagène

Génotype : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacI[F' roABlacIqZD M15 Tn10(Tetr)]*

Utilité : préparation de plasmides en grande quantité due à la présence de *endA1*.

XL1-Red strain:

Commercialisation : Stratagène

Génotype : *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacI mutD5 mutSmutT Tn10 (Tetr)*

Utilité : mutagenèse aléatoire

XL12-Blue :

Commercialisation : Stratagène

Génotype : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacI[F' proABlacIqZD M15 Tn10(Tetr) Amy Camr]*

Utilité : réalisation de transformation avec des efficacités supérieures à 5.109 colonies par μ g d'ADN.

Cellule hôte eucaryote: levure

Saccharomyces cerevisiae

- Génétique simple et bien connu.

- Nombreux vecteurs disponibles
- Taux d'expression des protéines assez bon intéressant (environ 100 mg / L de culture).
- Ne présente aucune toxicité
- Capable de synthétiser des protéines complexes et de réaliser des modifications post-traductionnelles simples.

Pichia pastoris, Kluyveromyces lactis, Yarrowialipolytica...

- Forte expression avec promoteurs inductibles
- sécrétion naturelle levée (bon rendement de production)

Mais: Génétique assez mal connue

Les vectrices navettes (**shuttle Vector**) pouvant fonctionner à la fois chez *E. coli* et chez la levure, car le clonage du gène se fait chez *E. coli*. Le vecteur est le plasmide 2 μ (seul disponible pour la levure).

CYC1:(séquence de terminaison) terminaison de transcription

Signal de sécrétion : ex. facteur α

2 origines de réPLICATION :

ORI pour la réPLICATION du vecteur dans *E. coli*,

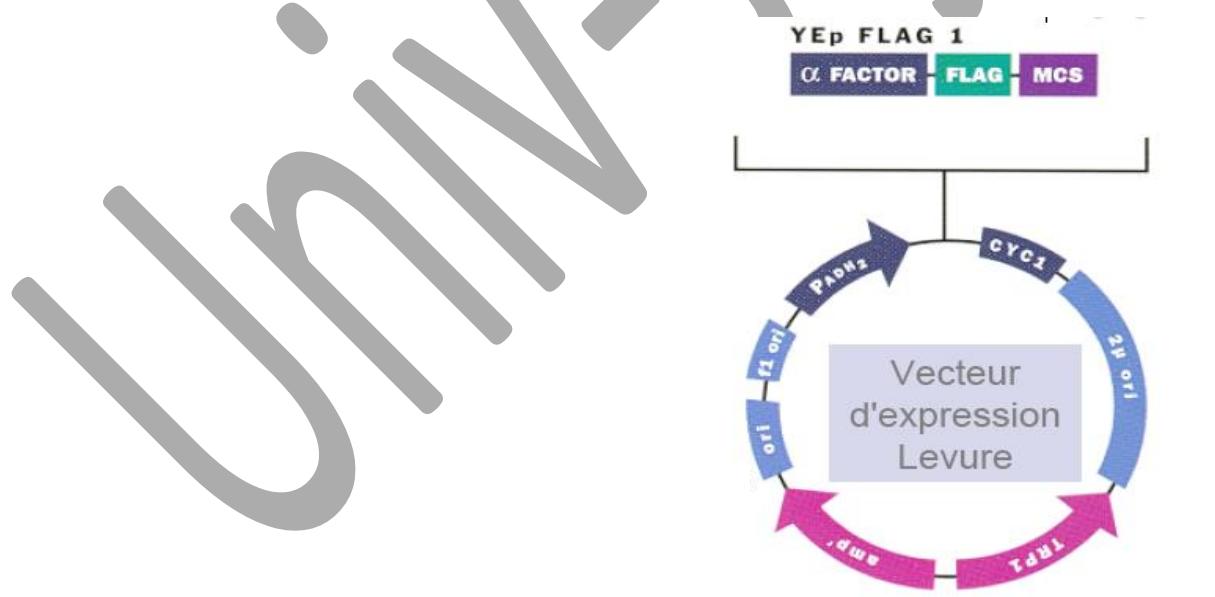
ARS (*AutonomousReplicatingSequence*) pour la réPLICATION dans la levure.

2 marqueurs de sélection :

Pour la bactérie on utilise un caractère de résistance à un antibiotique: l'ampicilline.

Pour les levures on utilise le gène URA3. Les cellules à transformer doivent être URA⁻ (pas de synthèse d'uracile).

Un promoteur : le promoteur de levure GAL 1 inductible par le galactose.

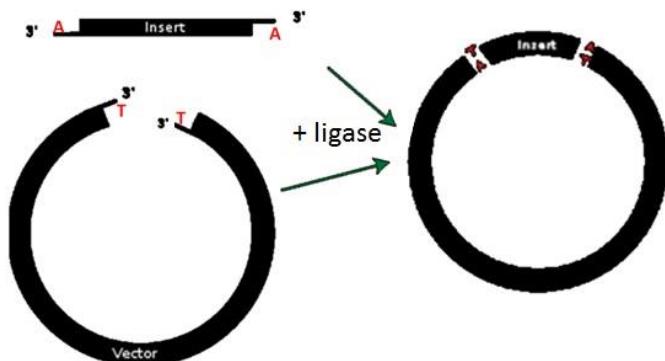


TA-Cloning

Le "TA-Cloning" est une méthode de clonage simple et rapide. Le principe de cette méthode repose sur le fait que les ADN polymérasées dépourvues d'activité exonucléase de 3' vers 5' (dont la Taq polymérase) ajoutent préférentiellement une Adénine (A) supplémentaire en 3' en fin d'élongation. La Taq a une activité terminal transférase.

Par le biais de vecteur de clonage fournis linéarisés avec une Thymine (T) sortante à chaque extrémité 3'OH (par exemple : pGEM-T), l'insertion du fragment d'intérêt sera facilité, grâce à la complémentarité des bases.

La sélection des clones recombinés s'effectue le plus souvent avec le système blanc/bleu de l'opéron lactose.



http://ol.saulnier.free.fr/espace_travail/clonage.html

V- Transformation

Il existe différentes techniques qui permettent de faire pénétrer de l'ADN dans une cellule eucaryote. Dans tous les cas, le but est de traverser la membrane cytoplasmique. Une fois dans le cytoplasme de la cellule, l'ADN sera transporté dans le noyau par un mécanisme non contrôlable.

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques est essentiellement fonction de la sensibilité des cellules, de l'efficacité de transfection recherchée et de l'objectif exact de l'expérience. Une cellule dans laquelle on a fait entrer un ADN est une cellule transfectée.

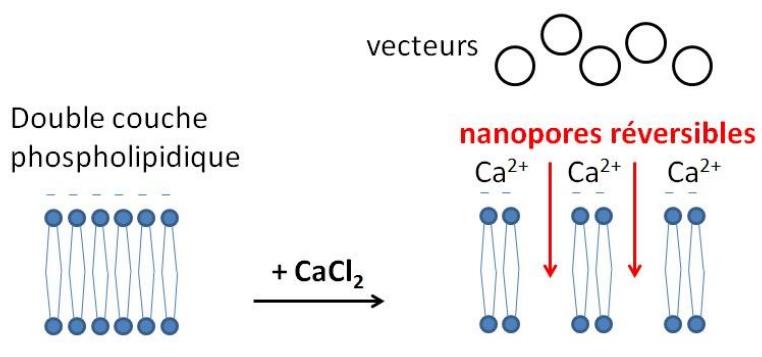
Principe de la technique de transformation classique des procaryotes

Avant sa transformation la bactérie est rendue compétente; c'est à dire que l'on s'assure que son état physiologique garantira une efficacité maximum de transformation. Pour cela il faudra obtenir des cellules venant de se diviser plusieurs fois au cours de la phase exponentielle : à ce moment les membranes sont étirées au maximum et la paroi cellulaire est plus perméable (une vieille paroi est plus réticulée), d'autre part la cellule est dans un état énergétique lui permettant de résister au mieux aux traitements traumatisants de la transformation.

Choc thermique (méthode au chlorure de calcium)

Les cellules refroidies sont mises en contact d'une solution concentrée de chlorure de calcium.

Le calcium chéate les phospholipides des membranes et participe à la rigidification des membranes à froid. De plus le calcium neutralise l'ADN transformant et lui permet de sédimerter au contact de la membrane avant sa pénétration. La pénétration de l'ADN transformant se fait au cours du choc thermique qui crée des pores dans les membranes qui laissent entrer l'ADN, mais également laissent sortir des nutriments vitaux. La mortalité des cellules est très importante lors du choc thermique.



Olivier SAULNIER

http://ol.saulnier.free.fr/espace_travail/clonage.html

Electroporation

Brève impulsion électrique provoquant l'ouverture temporaire de pores laissant entrer l'ADN. Cette technique est utilisée avec les bactéries, les levures et les cellules de mammifères.

• Electroporation

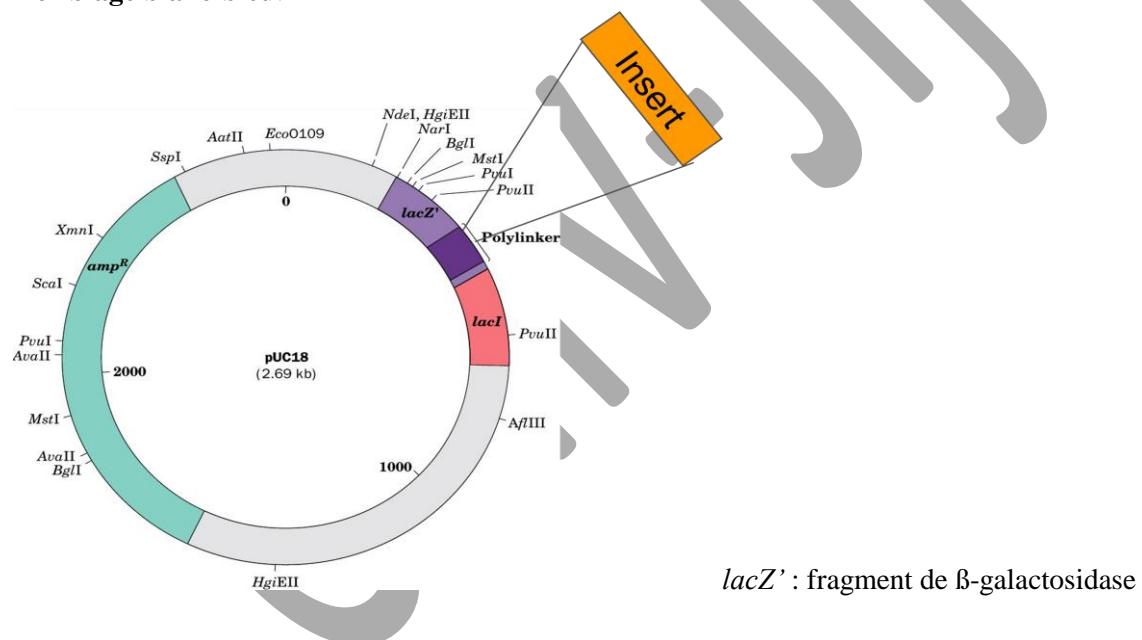
- Brève impulsion électrique provoquant l'ouverture temporaire de pores laissant entrer l'ADN
- Application
 - Cellules de mammifères en suspension
 - Levure (*S. cerevisiae*)
 - Bactéries (protoplastes *E. coli*)
- ⌚ Nécessite beaucoup de cellules, 50% de mort



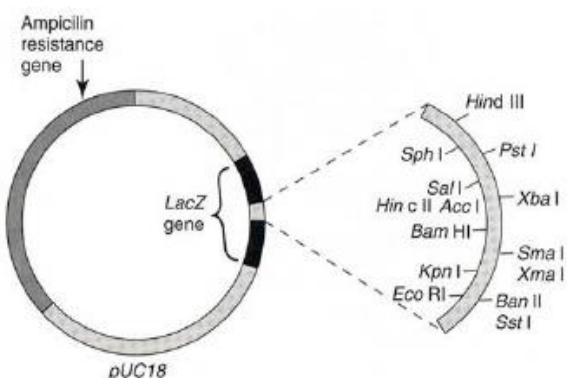
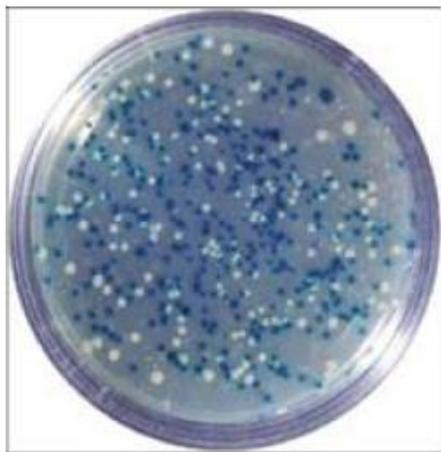
VI-La sélection

Les cellules transformées avec le vecteur contenant l'insert doivent pouvoir être identifiées. On utilise souvent des antibiotiques pour sélectionner les bactéries transformées. Selon les molécules, elles seront généralement efficaces pour sélectionner les procaryotes ou les eucaryotes, mais certaines d'entre elles seront efficaces pour les deux types cellulaires et pourront donc être utilisées dans les vecteurs utilisés successivement en procaryote et en cellule eucaryote (on parle de vecteur navette). On peut utiliser des antibiotiques toxiques pour les bactéries et un gène de résistance porté par le plasmide pour sélectionner les bactéries qui ont été transformées.

->criblage blanc-bleu:

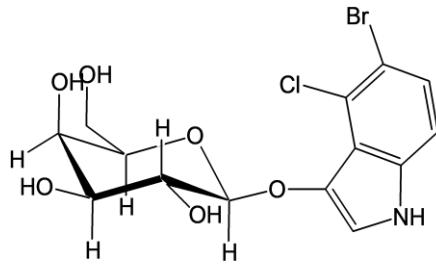


lacZ' : fragment de β -galactosidase

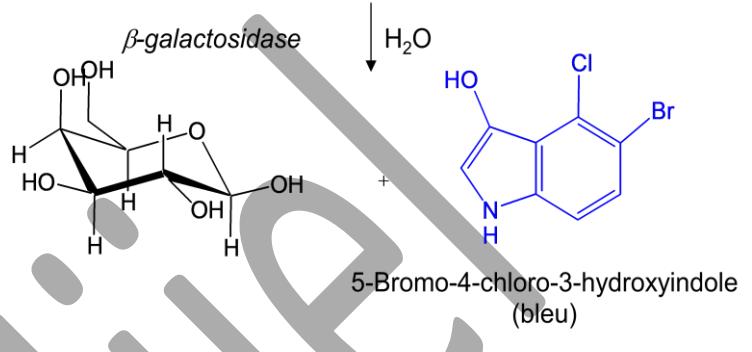


sans insert -> colonies bleues

avec insert -> colonies blanches



5-Bromo-4-chloro-3-indole- β -D-galactoside (**X-gal**)
(incolore)



5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindole
(bleu)

Pour pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur, cet inducteur est *le IPTG* (*isopropylthio-β-D-galactoside*).

VII- Banques d'ADN

Tout protocole de clonage dans des cellules comporte quatre étapes essentielles:

- Une méthode pour produire le fragment d'ADN à cloner.
- Une réaction qui insert le fragment dans le vecteur de clonage choisi.
- Un procédé pour introduire le vecteur recombinant dans une cellule hôte où il se réplique.
- Une méthode pour sélectionner les cellules qui ont incorporé le recombinant.

Il existe deux stratégies principales pour isoler des séquences spécifiques à partir de source complexe telles qu'un ADN génomique.

La première basée sur le clonage dans des cellules, consiste à fractionner l'ADN en fragments manipulables qui seront tous clonés. Une telle collection de clones représentant la totalité de l'ADN de départ est appelée une banque de gène 'genelibrary'. Il faut ensuite cribler la banque pour identifier le clone qui nous intéresse, en utilisant une méthode qui permet de le distinguer de tous les autres. La seconde stratégie consiste à amplifier sélectivement la séquence cible, directement de l'ADN source, par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et de cloner uniquement le fragment amplifié.

On distingue des banques d'ADNc et des banques d'ADN génomique. La banque d'ADNc représente la population des ARNs d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme à un moment donné. La seconde, la banque génomique, doit représenter l'ensemble de l'ADN génomique d'un individu. Une banque est donc la conversion d'une population d'ARN ou d'un génome en clones.

Banque d'ADNc

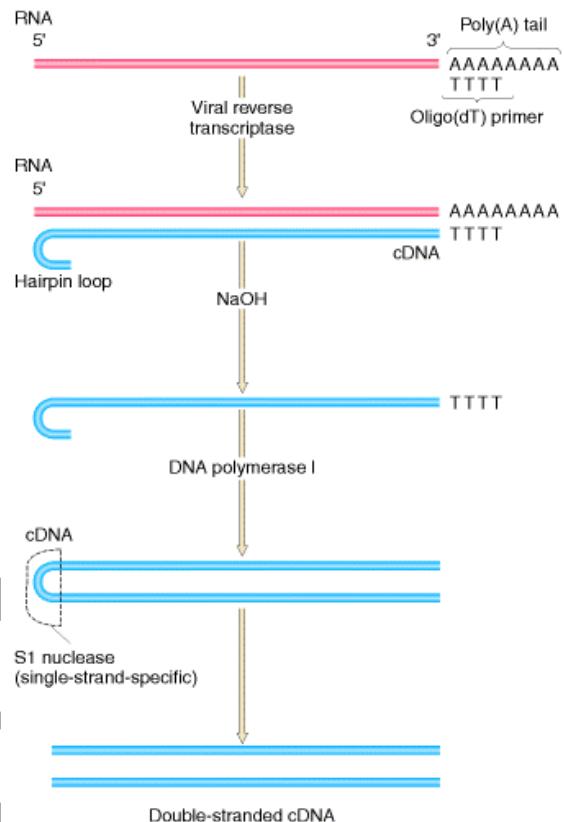
Le clonage de gènes extraits des cellules eucaryotes présente un problème particulier. En effet ces gènes contiennent généralement des exons, des introns et des régions régulatrices. Lors du clonage d'un gène eucaryote, il est préférable d'employer des versions du gène sans introns, car un gène contenant les introns serait difficilement maniable en raison de sa taille. On peut cependant synthétiser au laboratoire un gène qui ne renferme que des exons.

Il faut tout d'abord transformer les ARNs en ADNs qui sont alors appelés ADN complémentaires ou ADNc.

Pour la synthèse du premier brin, on utilise une reverse transcriptase (ADN polymérase ARN dépendante) et, comme pour toutes les ADN polymérasées, une amorce, qui est ici un oligonucléotide (oligodT). On détruit ensuite l'ARN par un traitement alcalin. Lorsque l'extrémité 5' de l'ADN se retourne et s'hybride sur lui-même en faisant une boucle en épingle à cheveux, on a une extrémité double brin qui peut servir d'amorce à une DNA polymérase ADN dépendante. On fait donc agir cette enzyme.

On obtient donc un ADNc double brin avec une extrémité en épingle à cheveux. Une telle structure ne peut pas être intégrée dans un vecteur. Pour avoir une extrémité franche on fait agir une DNase dégradant le simple brin (nucléase SI).

Dans ce cas, puisque les ARNm matures ont en moyenne des tailles de 9 à 16 kbp, un vecteur de type plasmide ou bactériophage seront suffisants.



b) Banque génomique

Une banque génomique représente l'ensemble du génome. On prépare donc de l'ADNg et on le coupe par une enzyme de restriction de façon à obtenir des fragments de 20 kb se recouvrant.

Pour ce faire, on utilise une enzyme qui coupe fréquemment dans le génome telle que Sau3A qui reconnaît la séquence /GATC. Cette enzyme reconnaît 4 bases et coupe donc en moyenne toutes les 44 bases soit environ toutes les 200 bases. Si la digestion est complète, les fragments sont trop petits pour être utilisables dans une banque, on préfère avoir des fragments plus grands et surtout se recouvrant. On effectue donc une digestion partielle en utilisant peu d'enzyme de façon à obtenir des fragments de 20kb.

Même si la digestion est bien calibrée, une digestion partielle ne donne pas que des fragments de 20 kb mais aussi des fragments plus petits et plus grands.

Cet ADN est borné par des extrémités 5' sortantes GATC générées par la digestion par Sau3A. Cette population de fragments d'ADN sera ensuite liquée aux bras droit et gauche d'un lambda obtenus par digestion par BamH1 (G/GATCC) générant des extrémités GATC, compatibles avec Sau3A. Après transformation par empaquetage *in vitro*, on obtient une population de phages dont les inserts représentent l'ensemble de l'ADN génomique. Dans certains cas la digestion de l'ADN est difficile du fait de la méthylation de l'ADN ou de la présence d'inhibiteur de la digestion qu'il n'a pas été possible d'éliminer lors de la purification de l'ADN. Dans ce cas on coupe l'ADN au hasard par sonication. Les extrémités seront rendues franches par action de la mungbean nucléase. Cette enzyme est préférée aux polymérasées ou à la

nucléase S1 car elle ne reconnaît pas les nicks qui dans ce cas sont nombreux. Les fragments d'ADN sont alors liés dans un vecteur soit directement soit après avoir ajouté des extrémités cohésives.

Les fragments résultants sont ligaturés dans des vecteurs. Selon la longueur des inserts que l'on veut obtenir, on utilise différents vecteurs < 5 kb : plasmide, 16-22 kb : phage λ , 42-50 kb : cosmide, 100-300 kb : BAC, PAC, > 300 kb : YAC

Pour un organisme donné il n'existe qu'une sorte de banque d'ADN génomique mais l'ARNm reflétant les seuls gènes qui sont transcrits et traduits à un moment particulier du cycle cellulaire. De plus, chez les organismes pluricellulaires une banque d'ADNc d'un tissu donné est différente de celle d'un autre tissu.

Criblage de banques

Le tri représente la partie la plus importante des expériences de clonage, il existe de nombreuses stratégies mais aucune n'est universelle. Le choix de la méthode dépend souvent des circonstances et des informations disponibles sur le gène recherché.

Le tri par sélection: lorsque le gène intéressant confère un phénotype particulier à l'hôte.

La résistance à un antibiotique particulier auquel les cellules sauvages sont sensibles : la culture sur un milieu contenant cet antibiotique ne fera apparaître que les clones transformés contenant ce gène précis

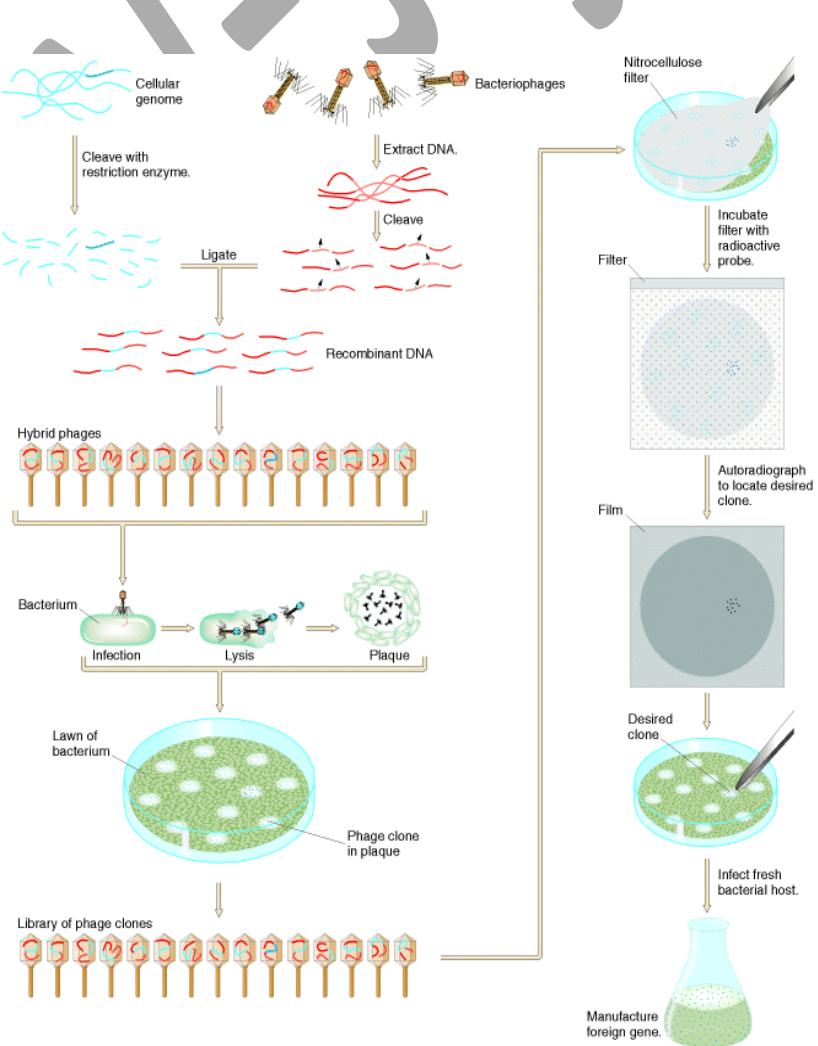
Le tri par criblage reste le plus courant : pour identifier un clone spécifique dans une banque d'ADN, on peut exploiter soit la séquence du clone soit la structure ou la fonction de son produit exprimé.

La détection immunologique du produit du gène représente un cible intéressant si le gène recherché est exprimé dans la cellule transgénique ce qui n'est pas toujours le cas.

Le criblage par hybridation : Des sondes sont utilisées pour cribler une banque afin de récupérer des clones d'un gène spécifique. Les sondes peuvent être marquées par des isotopes radioactifs ou par des composés qui, sous l'action de réactions chimiques ou une coloration, indiquent la position d'un clone spécifique dans une banque.

Exemple : Criblage d'une banque phagique

Hybridation avec une sonde spécifique



Purification des acides nucléiques

Dégénération des protéines

Dans le cas de la purification de l'ADN, la protéinase K est le plus souvent utilisée, et ce, en présence d'un détergent dénaturant. La digestion est effectuée en présence d'EDTA pour éviter l'action des DNases.

Pour l'ARN, des agents fortement dénaturants tels que les sels de guanidium sont utilisés. Ils ont comme rôle de dénaturer les protéines et en particulier les RNases.

Précipitation et élimination des autres composants de la cellule

Le phénol précipite les protéines

Le CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide) est un détergent cationique qui précipite les protéines et les polysaccharides. Ces polysaccharides sont présents en quantité plus ou moins grande chez les plantes.

Chromatographies

L'ADN peut s'accrocher sur des résines échangeuses d'ions, sur de la silice ou de la magnétite

- sur colonne d'échange d'ions, l'ADN s'accroche à faible force ionique et est élué à forte force ionique.

-sur silice (SiO_3) comme sur magnétite (Fe_3O_4), l'ADN est fixé à forte force ionique (2M NaI), la colonne est lavée par de l'alcool 50% et l'ADN peut être élué par de l'eau. L'ADN est donc directement utilisable pour les réactions suivantes.

L'ARN messager peut s'accrocher par hybridation sur colonne d'affinité sur laquelle on a fixé un oligodT comme ligand.

Récupération d'un fragment d'ADN d'un gel d'électrophorèse

« Freeze-squeeze » méthode: la bande est découpée, refroidie à -80°C et centrifugée. On récupère environ 50 % de l'ADN pour des fragments d'ADN d'environ 500 pb.

Papier DEAE : une bande de papier DEAE est placée en aval de la bande à récupérer sur le gel. La migration continue mais lorsque l'ADN arrive sur le papier, il reste bloqué sur le papier. Le papier est alors récupéré, lavé avec un tampon à faible force ionique puis élué avec un tampon contenant 1M NaCl.

Electroélution : dans les protocoles les plus simples, la bande est découpée puis placée en présence de tampon dans un boudin de dialyse. L'ensemble est placée dans un appareil d'électrophorèse, la bande migre hors du morceau de gel mais reste dans le tampon du boudin de dialyse. Des appareils ont été fabriqués pour récupérer les fragments d'ADN par électroélution. La bande est mise dans le réservoir de la cathode, l'ADN migre, sort de la bande, est pigée dans un réservoir intermédiaire contenant un tampon à haute force ionique.

VIII- La mutagenèse

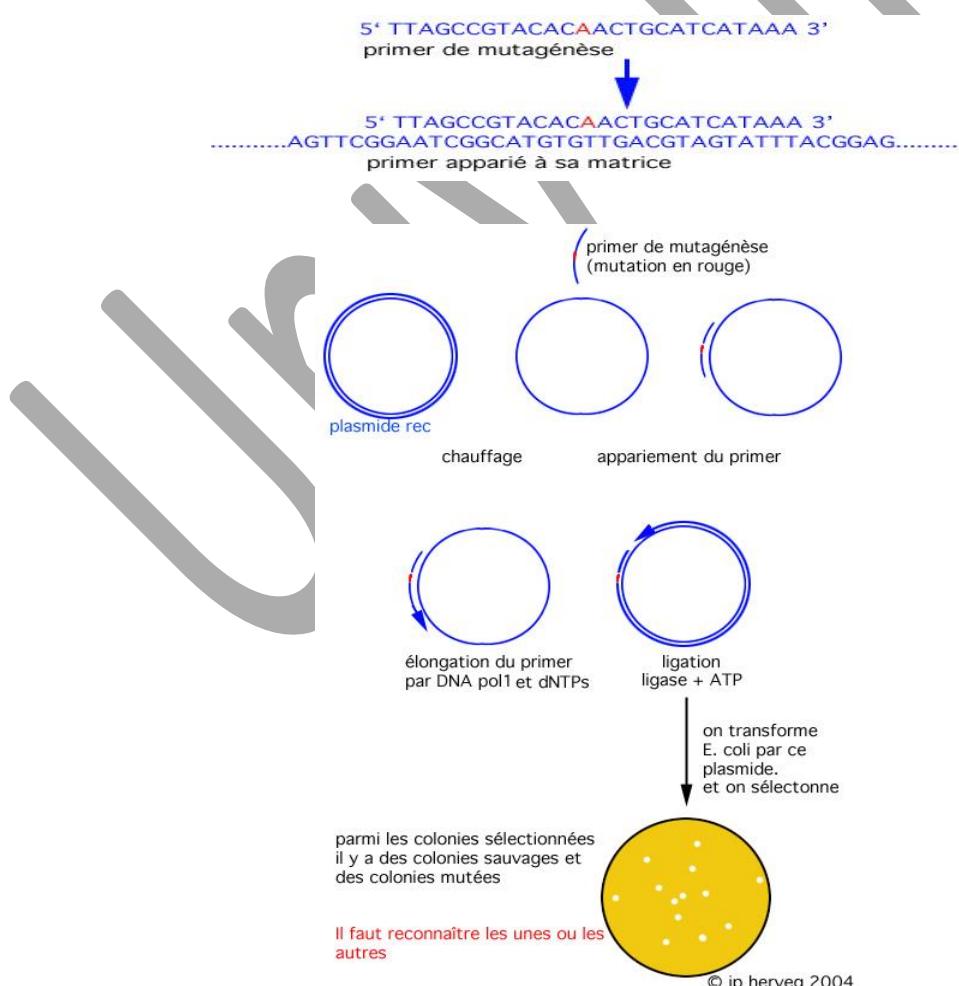
Il y a deux grands types de mutagenèse, la mutagenèse dirigée et la mutagenèse aléatoire.

La mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a pour objet de muter une séquence d'ADN à un endroit précis.

Les étapes d'une mutagénèse dirigée classique

- un oligonucléotide (primer) et une matrice qui porte la mutation à introduire est apparié à une séquence cible de la matrice d'ADN non mutée. Un paramètre crucial pour le succès de la mutagenèse dirigée est de choisir cet oligonucléotide mutagène. Par rapport à la séquence normale, cet oligonucléotide va souvent différer par un seul nucléotide qui correspond à une mutation ponctuelle, mais il peut porter aussi des mutations plus complexes comme des insertions, des délétions ou des mutations affectant plusieurs nucléotides contigus (adjacents).
- la longueur minimale d'un oligonucléotide de synthèse est définie par la complexité de la mutation. On introduit aisément des mutations ponctuelles avec des oligonucléotides de 25 bases. Des mutations plus compliquées nécessitent des amorces qui peuvent aller jusqu'à 80 bases, ce qui est proche de la limite supérieure des synthétiseurs automatiques. Il faut que les nucléotides qui ne s'apparient pas à la matrice (mismatches) se trouvent au milieu de l'oligonucléotide et non pas sur les bords de celui-ci.
- Cet oligonucléotide sert d'amorce à une polymérase qui initie une synthèse d'ADN *in vitro*. On produit ainsi un ADN double brin qui porte la mutation présente au départ dans l'oligonucléotide.
- transformation de bactéries



Un exemple de mutagenèse dirigée simple consiste à éliminer un site de restriction (unique site elimination mutagenesis) donnant des extrémités cohésives dans un plasmide. On ouvre le plasmide au site de coupure et on ajoute une polymérase (dépourvue d'activité 5'3' exonucléase) et des dNTP. On effectue ensuite une ligation des extrémités devenues franches. Dans cette expérience, on ajoute ou on retire généralement soit 2 soit 4 nucléotides. Le cadre de lecture est donc modifié et doit être pris en compte si l'expérimentation a pour but de produire une protéine.

Lorsqu'on veut changer une ou plusieurs bases dans un plasmide, on peut partir soit d'un ADN simple brin soit d'un ADN double brin.

a) A partir d'un ADN simple brin

Pour obtenir un ADN simple brin, on peut cloner le gène à muter dans un phage simple brin comme M13. En effet, la phase réplicative étant double brin, on peut la manipuler comme un plasmide et faire agir les enzymes de restriction.

Une méthode plus simple consiste à introduire dans le plasmide utilisé, une origine de réplication simple brin. On utilise les origines de réplication des phages M13 ou f1.

Pour obtenir un ADN simple brin, on infecte une bactérie comportant ce plasmide avec des phages qui produisent les enzymes nécessaires au développement du phage (réplication, protéines de l'enveloppe...). L'ADN du plasmide se retrouve dans les enveloppes du phage et il peut être purifié comme un virus. De plus, si on utilise comme phage "helper" un mutant déficient pour sa réplication, l'ADN du plasmide sera prédominant dans la préparation du virus.

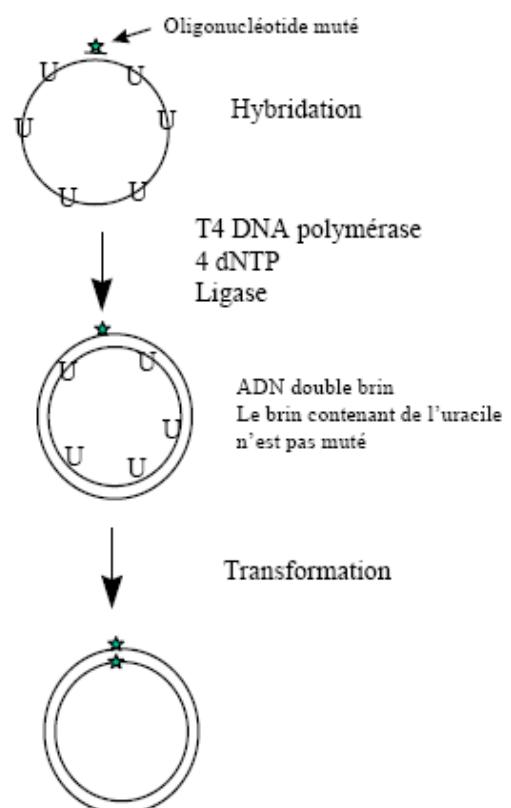
Technique de base : on hybride un oligonucléotide phosphorylé en 5', comportant la mutation désirée en son centre. La polymérisation du brin manquant amorcée par l'oligonucléotide est effectuée à l'aide d'une T4 DNA polymérase et une ligation entre l'extrémité 5' de l'oligonucléotide et le brin néosynthétisé est éventuellement effectuée avec la T4 DNA ligase. On est donc à ce stade en présence d'un hybride ADN sauvage, ADN muté.

Plusieurs techniques ont été trouvées pour éliminer le brin sauvage :

- Une première technique utilise lors de la polymérisation un analogue soufré d'un nucléotide. On effectue ensuite une coupure par Nsi I qui ne coupe pas le brin muté, néosynthétisé et comportant donc l'analogue soufré. Par contre, Nsi I coupe le brin matrice, sauvage qui ne comporte pas d'analogue soufré. Nsi I reconnaissant uniquement 4 bases, le brin sauvage est toujours coupé en plusieurs endroits. L'ADN est alors digéré par une exonucléase pour retirer tout le brin parental et resynthétisé par la T4 DNA polymérase.

- Une deuxième technique consiste à préparer de l'ADN simple brin dans une souche bactérienne *dutung-*. Ces souches *dut-* sont déficientes en UTPase et contiennent beaucoup d'UTP qui rentre en compétition avec le TTP. Les souches *ung* manquent d'uracil N-glycosylase, enzyme qui normalement enlève l'uracile incorporé dans l'ADN.

Ainsi, les souches *dut-*, *ung-* incorporent plusieurs uraciles dans l'ADN et donc dans le simple brin. Lors de la synthèse *in vitro*, l'UMP ne gêne pas, il n'est ni mutagène ni inhibiteur.



Après hybridation de l'oligonucléotide et polymérisation, on obtient donc un ADN hybride, un brin muté et un brin sauvage contenant de l'uracile. Si cet hybride est injecté dans une souche *ung*+, les uracyl N-glycosylases retirent les uracyles, produisant des sites apuriniques. Ces sites bloquent la synthèse d'ADN et seul le brin muté se réplique.

b) A partir d'un ADN double brin

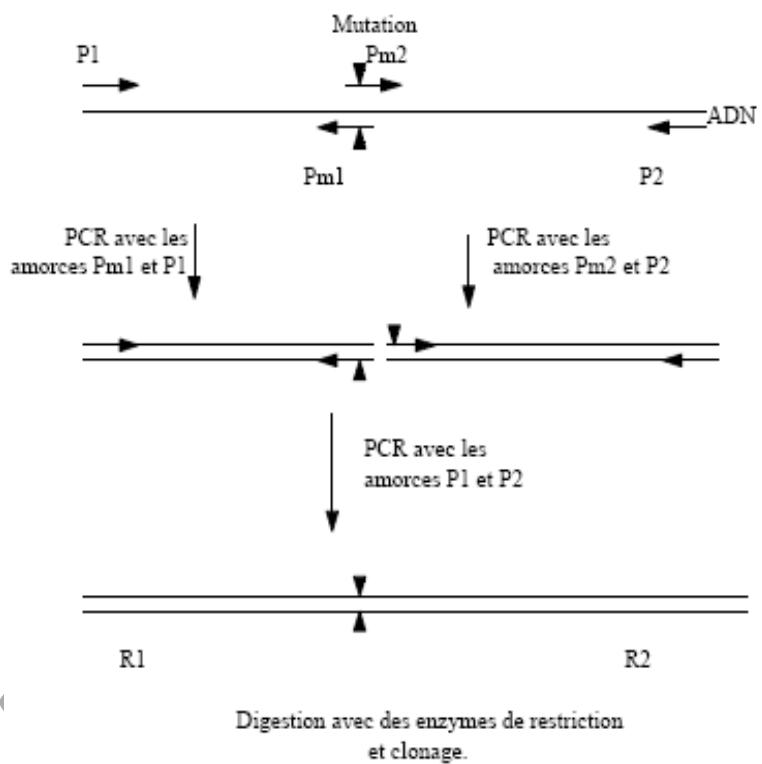
Utilisation des techniques de PCR en présence d'un oligonucléotide muté.

Il existe de nombreuses méthodes qui ont toutes le même principe, la mutation désirée est introduite dans une des amores.

Une méthode utilise quatre oligonucléotides. On fait deux amplifications séparées chacune avec un oligonucléotide externe et un oligonucléotide portant la mutation.

Les deux fragments obtenus séparément sont ensuite amplifiés ensemble avec les deux amores les plus externes.

On digère ensuite les deux extrémités par des enzymes de restriction et on lie dans le plasmide original.



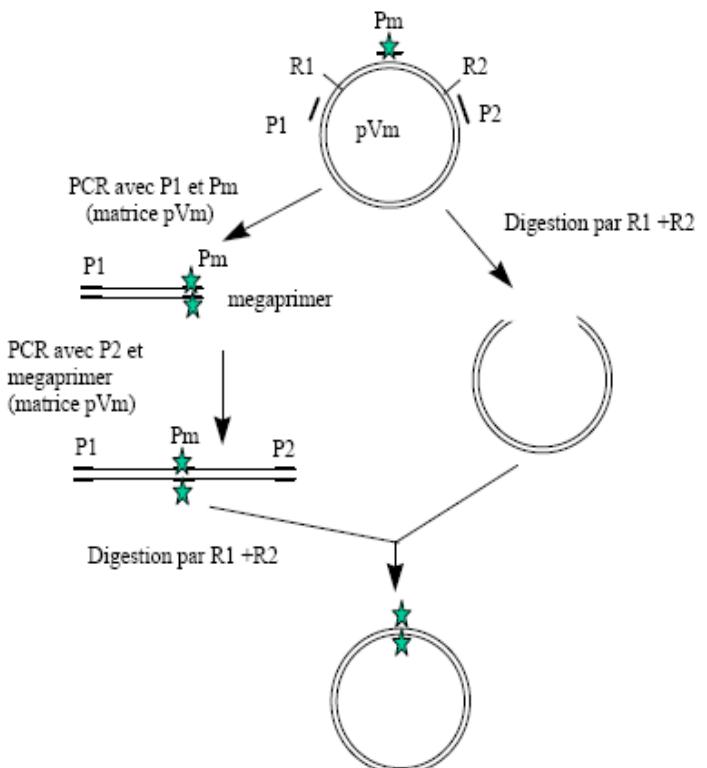
La méthode du "megaprimer".

Cette méthode utilise le résultat de la première amplification comme amorce pour la deuxième amplification (Sarkar et Sommer, 1990; Chen et Przybyla, 1994).

Une première amplification est faite avec deux amores (P1 + Pm), dont une comporte la mutation désirée (Pm). Une flèche grise indique la direction de la synthèse de l'ADN.

Le produit de PCR est purifié et utilisé directement comme amorce appelée "megaprimer" pour une deuxième réaction de PCR utilisant une troisième amorce (P2).

Comme précédemment, le produit de la deuxième amplification est digéré par une enzyme de restriction et introduit dans un plasmide.



Mutagenèse dirigée utilisant la PCR

Comme on a remarqué qu'un non-appariement (mismatch) situé au milieu d'un hybride entre un oligonucléotide et sa séquence complémentaire n'affecte pas l'efficacité de l'amplification PCR, on introduit à présent des mutations grâce à cette technique.

a. **avantages:** Les méthodes de mutagenèse dirigée basées sur la PCR offrent les avantages suivants :

Haut rendement: Le rendement de clones mutés est souvent si élevé qu'il ne faut pas sélectionner contre les matrices non mutées.

Peu de structures secondaires: Les températures élevées utilisées pour les polymérases thermostables diminuent le risque que la matrice d'ADN ne forme des structures secondaires qui réduiraient l'efficacité de la polymérisation d'ADN.

Un seul tube: Toutes les réactions se font dans un seul tube.

b. désavantages:

Certaines polymérases font des fautes: La polymérase thermostable peut introduire des mutations non voulues et ajouter des nucléotides en 3' des fragments d'ADN amplifiés. On peut minimiser le problème en utilisant la Pfu ADN polymérase plutôt que la Taq ADN polymérase.

Réactions trop complexes: Certaines méthodes nécessitent 3 ou 4 amores et 3 PCR consécutives.

Standardisation: Les conditions de la PCR doivent être mises au point pour chaque nouveau couple d'amores et pour chaque nouvelle matrice.

Temps d'elongation trop long: Il n'est pas toujours facile d'amplifier des fragments de plus de 2 à 3 kb.

Applications

La mutagenèse dirigée peut être utilisée pour enlever ou créer un site pour une enzyme de restriction.

Les codons de la séquence codante d'un gène peuvent être changés pour permettre la production de la protéine correspondante à des taux élevés dans d'autres organismes. Si on veut exprimer un gène dans *E. coli*, on peut muter certains codons en codons qui seront traduits très efficacement dans cette bactérie.

On peut étudier l'effet des mutations sur la structure et la fonction des protéines. Si la séquence codant une protéine est connue, on peut utiliser un oligonucléotide synthétique pour changer un nucléotide en un autre et donc un acide aminé en un autre. Il suffit ensuite de réintroduire le gène muté dans une cellule pour voir l'effet de ce changement d'acide aminé. Si la protéine étudiée est une protéine de membrane, on peut mettre en évidence les acides aminés qui sont importants pour l'insertion et l'ancrage (l'implantation) de ces protéines dans la membrane.

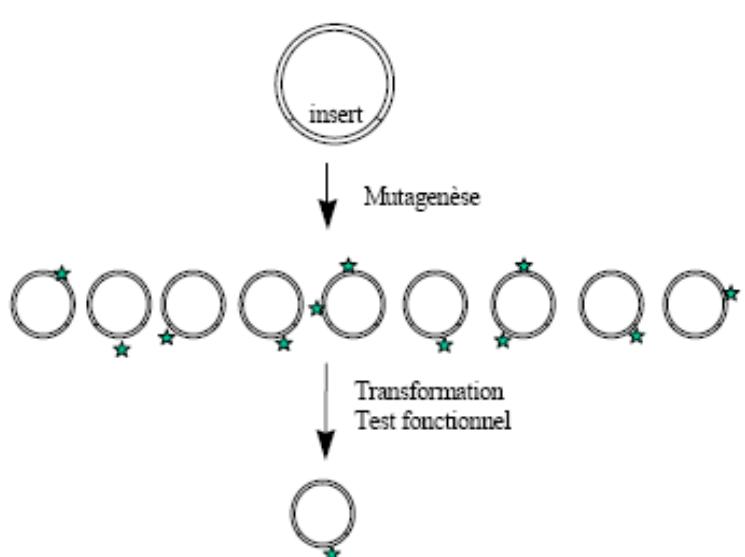
Il est parfois aussi intéressant de fabriquer des protéines chimériques en remplaçant une partie d'une protéine par la séquence homologue d'une autre protéine.

La mutagenèse aléatoire

La mutagenèse aléatoire génère des mutations n'importe où dans l'ADN. Les mutants sont ensuite triés.

On peut générer des mutants *in vivo* ou *in vitro*. Dans le premier cas, les bactéries sont soumises directement au traitement. Dans le deuxième cas, le plasmide portant le gène est purifié, modifié puis réintroduit dans une nouvelle bactérie.

On peut utiliser des produits qui modifient les bases appelées des agents mutagènes ou utiliser des enzymes.



a) Utilisation d'agents mutagènes

De nombreuses molécules abîment l'ADN et peuvent être utilisées pour effectuer de la mutagenèse.

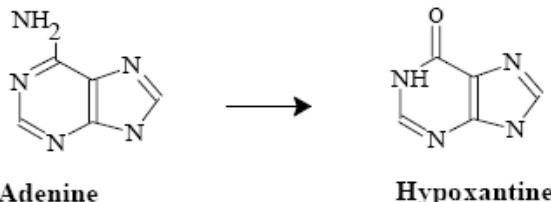
- Désamination des bases

La désamination est une des modifications les plus courantes de l'ADN. Les groupements amines de l'adénine, de la cytosine et de la guanine peuvent être retirés soit spontanément soit à l'aide de nombreux produits chimiques.

Lorsque l'adénine est désaminée, on obtient l'hypoxantine, lorsque la guanine est désaminée on obtient la xantine, et lorsque la cytosine est désaminée on obtient l'uracile.

La désamination des bases entraîne des mutations car elle entraîne simultanément des désappariements. Par exemple, l'hypoxantine, provenant de l'adénosine s'apparie avec la cytosine au lieu de la thymine. De même, l'uracile provenant de la désamination de la cytosine s'apparie avec l'adénine au lieu de la guanine.

Si la base reste modifiée jusqu'à la réplication, il y a mutation. Par exemple, si une adénine reste désaminée durant la réplication, il y aura un C sur le brin néosynthétisé à la place du T. Dans les réplications suivantes, on aura un G à la place du A et en fait, on aura une transition AT vers GC.



Plusieurs molécules peuvent être utilisées pour désaminer les bases de l'ADN :

- l'hydroxylamine désamine la cytosine et donc est responsable de transition GC vers AT. Comme l'hydroxylamine ne rentre pas dans les cellules, cette molécule ne peut être utilisée qu'*in vitro*.
- le bisulfite de sodium désamine les cytosines mais l'ADN doit être simple brin.
- l'acide nitreux désamine la cytosine, l'adénine et la guanine. Il peut causer des transitions AT vers GC comme des transitions GC vers AT. De plus il est peu spécifique et peut aussi causer des délétions.

- Alkylation

Les agents alkylants ajoutent des groupes alkyls (CH_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\ldots$) aux bases. On peut citer l'éthyle méthane sulfonate (EMS) ou la nitrosoguanine. Les atomes les plus réactifs sont le N7 de la guanine, le N3 de l'adénine ou le O⁶ de la guanine. Cette alkylation n'est souvent pas reconnue par les systèmes de réparation et entraîne une différence d'appariement.

- Irradiation UV

L'ADN absorbe à 260 nm du fait des doubles liaisons conjuguées présentes sur les bases. Les photons absorbés augmentent l'énergie des bases et les doubles liaisons peuvent réagir avec d'autres atomes présents à proximité.

L'altération la plus souvent rencontrée est la formation de dimère de pyrimidine entre deux bases consécutives.

Les modifications des bases sont réparées et il n'y a généralement pas de mutation. Cependant, si la réplication a lieu avant la réparation, la base modifiée peut servir de matrice à une base différente et ainsi occasionner une mutation.

b) Utilisation d'enzymes

La méthode actuellement utilisée utilise les erreurs faites par une polymérase dépourvue d'activité 3'5' exonucléase encore appelée activité de correction. L'ADN polymérase Taq est une de ces enzymes.

Référence

- **N. Okafor**, *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1st Edition, 2007. Pub. location Boca Raton, Imprint CRC Press, DOI: <https://doi.org/10.1201/b21298>
- **J. E. Smith**, *Biotechnology*, Fourth Edition, Cambridge University Press 2004
- **E. Passarge**. 2007. *Color Atlas of Genetics*. Third edition, Thieme Stuttgart, Germany
- **V. Ecochard, D. Fournier, L. Nieto, L. Paquereau**, 2011. *Techniques et Stratégies en Biologie Moléculaire*. <http://www.m2p-egpr.ups-tlse.fr/>
- **A. Bashein**. 2007-2008. *Regulation of gene expression*. Site internet
- **T.A. BROWN**, 2010, *GENE CLONING AND DNA ANALYSIS, An Introduction*, Sixth Edition, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication
- **S. Hogg**, 2005, *Essential Microbiology*, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, England
- **M. El-Azizi**, 2009, *Cloning and expression of insulin gene*. <https://fr.scribd.com/doc/20653295/Lecture-3-Cloning-and-Expression-of-Insulin-Gene-in-Bacteria>
- *Applications de la Biotechnologie dans l'industrie*, 2003. Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre (CAR/PP) Plan d'Action pour la Méditerranée
- *Sites internet*